

Ocena

pracy doktorskiej mgr Darii Witkowskiej pt. „Wpływ wisfatyny na poziom reaktywnych form tlenu oraz apoptozę ludzkich komórek raka okrężnicy linii *Caco-2 in vitro*”

Oddana do oceny praca liczy 64 strony wydruku komputerowego, w tym na 10 stronach zestawionych zostało 139 pozycji piśmiennictwa źródłowego i monograficznego. Wyniki badań własnych zestawiono w 2 tabelach i na 5 rycinach. Autorka podzieliła pracę w sposób klasyczny na 10 działów obejmujących: wstęp, założenia i cele pracy, materiał i metody, wyniki badań i ich omówienie, wnioski, dyskusję, piśmiennictwo, streszczenie w języku polskim i angielskim. Dodatkowo przedstawiono wykaz skrótów zastosowanych w tekście oraz wykaz tabel i rycin.

We wstępie szczegółowo omówiono problematykę nadwagi i otyłości w etiologii nowotworów, szczególnie raka jelita grubego. Omówiono także znaczenie adipocytokin, stresu oksydacyjnego i stanów zapalnych w rozwoju nowotworów przewodu pokarmowego. Podjęto także próbę omówienia udziału wybranych adipocytokin w rozwoju i progresji nowotworów jelita grubego.

Nadwaga i otyłość osiągnęły obecnie rozmiar światowej epidemii; nadwagę stwierdza się u ponad połowy mieszkańców Europy, a otyłość występuje u 10-25% dorosłych mężczyzn i 10-30% dorosłych kobiet. Najlepszym wskaźnikiem dla oceny nieprawidłowej masy ciała jest tzw. wskaźnik masy ciała (BMI), koreluje on w wysokim stopniu z masą tkanki tłuszczowej oraz zachorowalnością i śmiertelnością, odzwierciedlając ryzyko rozwoju chorób zależnych od otyłości. Zarówno masa jak i dystrybucja tkanki tłuszczowej mają decydującą rolę w patogenezie chorób związanych z otyłością. Otyłość brzuszna (androidalna), typowa dla mężczyzn wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zgonu w porównaniu do typowej dla kobiet otyłości obwodowej (gynoidalnej). W ocenie dystrybucji tkanki tłuszczowej pomocny może być także wskaźnik WHR (talía/biodra powyżej 0.95(M) i 0.80(K)) oraz WC (obwód w pasie, >102cm(M) i >88cm (K)). Wzrost BMI powyżej 25kg/m² zwiększa ryzyko rozwoju raka jelita grubego, raka piersi, raka błony śluzowej macicy, nowotworów złośliwych nerki i krtani. Przyczyny takiego stanu rzeczy nie są do końca poznane, uważa się, że nadmiar tkanki tłuszczowej jest źródłem zwiększonej sekrecji adipocytokin, które zmieniają metabolizm (m.in. zwiększają wydzielanie insuliny, generują stres oksydacyjny i wywołują stany zapalne) i mogą w ten sposób inicjować rozwój lub/i progresję choroby nowotworowej. Dodatkowo wiele typów nowotworów rozwija się w sąsiedztwie tkanki tłuszczowej, której komórki mogą różnicować się w niedojrzałe pre-adipocyty, stając się adipocytami zależnymi od nowotworu (CAA), sprzyjając wzrostowi,

angiogenezie i przerzutowaniu. Rak jelita grubego (CRC) jest w Polsce drugim co do częstości zachorowań nowotworem u kobiet a trzecim u mężczyzn, oraz trzecim u obydwu płci pod względem śmiertelności. W etiologii ważnymi czynnikami są dieta, alkoholizm i nikotynizm. Przewlekłe stany zapalne w obrębie przewodu pokarmowego również sprzyjają transformacji nowotworowej komórek jelita grubego. Światowa Organizacja Zdrowia określiła, że nadwaga oraz otyłość zwiększają ryzyko rozwoju raka jelita grubego. Zwiększona ilość tkanki tłuszczowej prowadzi do zwiększonego uwalniania do krwi adipocytokin (wisfatyny, leptyny, adiponektyny, waspiny, chemeryny), które są związane z chorobami towarzyszącymi otyłości. Otyłość indukuje także systemowy stres oksydacyjny oraz ogólnoustrojowy stan zapalny o umiarkowanym nasileniu. Adipocyty białej tkanki tłuszczowej wydzielają wiele białek związanych z metabolizmem glukozy (leptyna, adiponektyna, rezystyna), z metabolizmem tłuszczów (CETP), stanem zapalnym (TNF-alfa, IL-6, IL-8, CRP, MCP-1, PAI-1) regulacją ciśnienia krwi (angiotensyna II). Stężenie tych białek koreluje dodatnio z ilością białej tkanki tłuszczowej. Zwiększone wydzielanie cytokin prozapalnych, białek związanych z zapaleniem oraz adipocytokin zapalnych prowadzi do uogólnionego stanu zapalnego o umiarkowanym nasileniu. W przebiegu reakcji zapalnej dochodzi także do zaburzenia równowagi pro oksydacyjnej i antyoksydacyjnej, co prowadzi do rozwoju stresu oksydacyjnego. Konsekwencją utleniania makromolekuł przez reaktywne formy tlenu (RFT) oraz wolne rodniki tlenowe (WRT) może być podwyższone ryzyko transformacji nowotworowej. W piśmiennictwie istnieje wiele danych dotyczących wpływu adipocytokin (szczególnie adiponektyny, leptyny i wisfatyny) na rozwój i progresję nowotworów jelita grubego. Cytokiny zapalne i stres oksydacyjny uczestniczą w indukcji i mechanizmie apoptozy. Apoptoza jest zaprogramowanym genetycznie procesem śmierci komórki, który jest konieczny dla zachowania homeostazy. Ograniczenie tego procesu może indukować choroby z autoagresji lub warunkować oporność komórek nowotworowych na stosowane formy terapii. Komórki nowotworowe cechuje „unikanie” apoptozy wskutek mutacji i delecji genów supresorowych kodujących białka biorące udział w regulacji apoptozy, genów kodujących kaspazy, genów kodujących białka proapoptotycznego oraz genu kodującego Apaf-1. Istnieje także inny rodzaj apoptozy, który niezależny jest od kaspaz. Dochodzi w tym procesie, trwającym dłużej do zaburzenia fosforylacji oksydacyjnej, obniżeniu ulega potencjał przebłonowy mitochondriów i następuje ich destrukcja. W indukcji i przebiegu apoptozy RFT mogą pełnić dwojaką rolę. Nadmiar może być czynnikiem indukującym, a drugiej strony RFT mogą pełnić funkcje regulacyjne jako tzw. wtórne przekaźniki sygnału śmierci. Nadmierne wytwarzanie RFT przy niewydolności enzymatycznych i nieenzymatycznych systemów antyoksydacyjnych może prowadzić do stresu oksydacyjnego, indukującego transkrypcję genów kodujących białka związane ze stanem zapalnym, a który z kolei może indukować tworzenie RFT.

Jako cel swych badań Autorka podjęła próbę zbadania wpływu związanej z otyłością adipocytokiny wisfatyny na wytwarzanie pochodnych reaktywnych form tlenu oraz reaktywnych form tlenu na apoptozę komórek raka okrężnicy linii Caco-2 w warunkach *in vitro*. Celem szczegółowym było określenie żywotności oraz odsetka komórek apoptycznych i nekrotycznych w hodowli komórek ludzkiego raka okrężnicy w warunkach *in vitro* stymulowanych wisfatyną w różnych stężeniach, ocena wpływu wisfatyny na wytwarzanie RFT oraz ocena stężenia cytokin prozapalnych TNF-alfa, IL-1 beta w supernatantach pochodzących z komórek ludzkiego raka okrężnicy linii Caco-2 poddanych stymulacji wisfatyną w różnych stężeniach.

Badania przeprowadzono w Katedrze i zakładzie Fizjologii, Biochemii Ogólnej ŚIUM w Zabrze oraz Zakładzie Inżynierii Systemów, Instytutu Automatyki Politechniki w Gliwicach. Do badań użyto komórek ludzkiego raka okrężnicy linii Caco-2, ludzkiego gruczolakoraka okrężnicy izolowanego od 72-letniego pacjenta rasy kaukaskiej. Komórki poddano działaniu różnego stężenia wisfatyny: 0.1, 10 oraz 100 ng/ml przez okres 24 godzin. Po odbankowaniu komórek z ciekłego azotu, komórki namnożono w butelkach hodowlanych, oraz wybarwiono błękitem trypanu i policzono z użyciem automatycznego licznika komórek TC20 w celu określenia liczby żywych i martwych komórek. Celem pomiaru żywotności komórek wykorzystano test MTS z wykorzystaniem oceny aktywności oksydoredukcyjnej mitochondriów. Dla oznaczenia reaktywnych form tlenu wykorzystano pochodną dichlorofluoresceiny, a dla wykrycia anionorodnika ponadtlenkowego cytometrii przepływowej. Ilość komórek apoptycznych, nekrotycznych oraz żywych po 24 godzinach hodowli, poddanych lub nie działaniu wisfatyny oceniano za pomocą cytometrii przepływowej zestawem Anexine V-FITC. Stężenia cytokin prozapalnych TNF-alfa i IL-1beta oznaczono immunoenzymatycznie za pomocą testów Elisa.

Zgodność rozkładu zmiennych ciągłych z rozkładem normalnym weryfikowano testem zgodności Shapiro-Wilka. Analizę porównawczą realizowano testem ANOVA z korektą Benferoniego. Za znamienne statystycznie przyjęto zmiany dla poziomu istotności $p < 0.05$.

Uzyskane wyniki zostały przez Autorkę opisane w bardzo czytelny sposób. Największe obniżenie żywotności komórek linii Caco-2 oraz wzrost ilości komórek apoptycznych obserwowano w grupie komórek stymulowanych wisfatyną w najniższych stężeniach. Wzrost żywotności i obniżenie nasilenia apoptozy obserwowano natomiast po stymulacji wisfatyną w najwyższym stężeniu (100 ng/ml), podobnie jak obniżenie wytwarzania RFT oraz cytokin prozapalnych.

W dyskusji Autorka w sposób dowodzący dobrej znajomości podjętej tematyki omawia wyniki badań własnych, porównując je z wynikami uzyskiwanymi przez innych autorów, co jest niezwykle trudne ze względu na niewielką ilość badań o podobnym profilu. Zakończeniem pracy są wnioski.

Autorka sformułowała trzy wnioski, które znajdują potwierdzenie w uzyskanych wynikach i są częściowo zbieżne z wynikami uzyskanymi w innych ośrodkach. Według Autorki efekty działania wisfatyny zależą od użytego jej stężenia. Efekt antyoksydacyjny i antyapoptyczny obserwowano, w przypadku poddania działaniu komórek Caco-2 wisfatyną w największym stężeniu.

Oceniana praca jest dobrze zredagowana, proporcje między rozdziałami zostały zachowane. Godne uwagi jest także bardzo dobrze dobrane piśmiennictwo, wyczerpujące realizowany temat.

Reasumując, Autorka wykazała się dobrym przygotowaniem teoretycznym, dużą umiejętnością zaplanowania i przeprowadzenia badań analitycznych, a także zdolnością krytycznej dyskusji naukowej. Autorka nie ustrzegła się drobnych usterek (literówki) oraz potocznych określeń np. poziom zamiast stężenie czy spadek zamiast obniżenie, ale nie mają one wpływu na pozytywną ocenę pracy. Stąd uważam, że praca doktorska mgr Darii Witkowskiej pt., „Wpływ wisfatyny na poziom reaktywnych form tlenu oraz apoptozę ludzkich komórek raka okrężnicy linii Caco-2 *in vitro*” spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora medycyny, co upoważnia mnie do przedłożenia Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach wniosku o dopuszczenie mgr Darii Witkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (DZ.U. Nr65, poz. 595, z późn. zm.).

Bydgoszcz, dnia 02.09.2019 r.

Kierownik
Katedry i Kliniki Chirurgii Plastycznej,
Rekonstrukcyjnej i Estetycznej

dr hab. n. med. Henryk Witmanowski, prof. UMK